

На правах рукописи



**УСТЕНКО КСЕНИЯ ВАДИМОВНА**

**ТРАНСГЕНЕРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
ПРИ РАДИОЧАСТОТНОМ ОБЛУЧЕНИИ  
В ЮВЕНИЛЬНЫЙ И ПУБЕРТАТНЫЙ ПЕРИОД**  
(на примере беспозвоночного животного  
*Daphnia magna*)

Специальность 1.5.1 Радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Обнинск – 2021

Работа выполнена в Обнинском институте атомной энергетики – филиале ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (ИАТЭ НИЯУ МИФИ)

**Научный руководитель:**

**Сарапульцева Елена Игоревна**, доктор биологических наук, профессор, НИЯУ МИФИ.

**Официальные оппоненты:**

**Жаворонков Леонид Петрович**, доктор биологических наук, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, профессор Научно-образовательного отдела;

**Перов Сергей Юрьевич**, доктор биологических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова», ведущий научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», биологический факультет.

Защита диссертации состоится «17» ноября 2021 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.013.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ) Министерства науки и высшего образования РФ по адресу: 249032, Калужская обл., г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, зд. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ВНИИРАЭ: <https://ds.rirae.ru/>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_

Ученый секретарь  
диссертационного совета



к.б.н. Бондаренко Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Неионизирующие низкоинтенсивные электромагнитные радиочастотные поля в диапазоне от 300 МГц до 300 ГГц широко используются в военной, радио- и телевизионной передаче данных, в системах беспроводной связи и промышленности. В данном диапазоне работают базовые станции сотовой радиосвязи. Все вышесказанное создает условия для тотального накопления суммарной энергетической экспозиции в окружающей среде. Международными и отечественными организациями разработаны санитарно-гигиенические нормы безопасного воздействия электромагнитного излучения для населения. Однако до сих пор остается открытым вопрос о разработке экологических нормативов, ограничивающих электромагнитное воздействие на природные экосистемы.

В научных публикациях сообщается о генетических и морфофизиологических изменениях в клетках и целостном организме животных и растений, подвергающихся воздействию низкоинтенсивных радиочастотных полей (Belyaev et al., 2017; Vijayalaxmi, 2019; Marynchenko et al., 2019). Показано, что электромагнитное излучение радиочастотного диапазона может не только нарушать, но и полностью подавлять разные стадии онтогенеза (Карташев, Большаков, 2011; Merhi, 2012). Специалисты считают, что превышение естественного фона электромагнитного излучения может повлечь за собой изменения в популяциях и сообществах разных представителей биоты (Григорьев, 2014-2020; Vijayalaxmi, 2019). Учитывая, что при развитии современных радиолокационных технологий, электромагнитное воздействие на компоненты окружающей среды будет только расти, актуальной задачей радиобиологии является анализ закономерностей хронического действия радиочастотных электромагнитных полей, в том числе отдаленных последствий для организмов, имеющих ключевые значения в экосистемах.

В водных экосистемах большое экологическое значение имеют ракообразные рода *Daphnia*. Они обитают повсеместно в пресноводных водоемах, участвуя в процессах самоочищения водоёмов и являясь

важным звеном пищевой цепи – кормом промысловых рыб. Известно, что ограничение рациона приводит к снижению скорости роста популяции *Daphnia* (Acharya et al., 2004; Preuss 2009; Фролова 2014) и, как следствие, повышению токсичности ксенобиотиков для других гидробионтов (Pieters et al., 2009). Анализ биологических эффектов у этих животных как референтных планктонных видов является актуальной задачей радиобиологического исследования влияния длительного радиочастотного облучения в разные периоды онтогенеза и трансгенерационных изменений в нескольких необлученных поколениях, в том числе, культивируемых в условиях голодания.

**Степень разработанности темы.** В литературе имеется много, порой противоречивых данных, о биологическом действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения на беспозвоночных животных. Показано, что облучение родительского поколения *D. magna* в электромагнитном поле (240 Гц, 75 мТ) увеличивает долю нежизнеспособного потомства и вызывает снижение размеров новорожденных особей в четырех последующих поколениях (Крылов, 2008). Действие низкоинтенсивного электромагнитного поля с частотой 30 МГц приводит к появлению в потомстве *D. magna* особей с дефектами развития, снижению выживаемости, плодовитости и замедлению роста (Воробьева и др., 2016; Папоян и др., 2017). Выявлено снижение метаболической активности у *D. magna* после острого облучения в электромагнитном поле с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>. Показано, что нарушение метаболической активности не влияет на выживаемость рачков в отдаленные сроки после краткосрочного воздействия (Ускалова, 2018). Облучение в электромагнитном поле с частотой 42,25 ГГц 7-суточных (на стадии созревания) и 14-суточных (в период половозрелости) *D. magna* снижает плодовитость и увеличивало чувствительность к токсическому действию кадмия (Гапочка и др., 2012). В ряде исследований показано усиление токсического действия инсектицидов (Pieters et al., 2009; Pavlaki et al., 2014) и солей тяжёлых металлов (Neugens et al., 2006; Шашкова и др., 2013) на гидробионтов в условиях голодания. Однако действие ионизирующего излучения в условиях ограничения пищи не изменяется (Dallas et al., 2012; Fuller et al., 2015). Негативный эффект наблюдался в результате голодания *D. magna* независимо от эффекта

облучения рачков в относительно малых дозах (Sarapultseva et al., 2019).

**Цель работы** – анализ закономерностей формирования прямых и отдаленных эффектов хронического низкоинтенсивного радиочастотного облучения ракообразных *Daphnia magna* в ювенильный и пубертатный период онтогенеза, в том числе, в условиях голодания по изменению морфо-физиологических и биохимических показателей в модельных опытах.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать изменение выживаемости и плодовитости, а также морфометрических показателей у ракообразных *D. magna* после хронического радиочастотного воздействия в разные периоды онтогенеза в непосредственно облученном поколении.

2. Проанализировать изменение метаболической активности в облученном поколении ракообразных *D. magna* и сопоставить изменения на биохимическом уровне с морфо-функциональными эффектами.

3. Проанализировать трансгенерационные морфо-физиологические эффекты в нескольких необлученных поколениях после длительного электромагнитного облучения родительских особей *D. magna* в разные периоды онтогенеза. Выявить наиболее радиочувствительные периоды, вызывающие длительные эффекты в поколениях.

4. Сопоставить морфо-физиологические изменения с нарушением метаболической активности в поколениях ракообразных и оценить влияние голодания на оксидативный стресс. Экспериментально обосновать влияние голодания на жизнеспособность облученных особей и их необлученного потомства.

5. Описать возможные механизмы формирования прямых и трансгенерационных эффектов хронического низкоинтенсивного радиочастотного облучения *D. magna* в разные периоды онтогенеза.

**Научная новизна.** Впервые, на примере партеногенетически размножающихся *D. magna* обнаружено, что ювенильный период, в который происходит закладка и формирование яиц, является более чувствительным к низкоинтенсивному радиочастотному облучению периодом и критическим для развития полноценного потомства, чем пубертатный период, когда происходит формирование эмбрионов в

выводковой камере. Облучение и голодание животных независимо и значимо влияют на снижение плодовитости, не нарушая при этом выживаемость. Впервые обнаружено, что хроническое радиочастотное облучение вызывает цитотоксический эффект в клетках облученных *D. magna*. Обнаруженные эффекты сохраняются в первом необлученном поколении и не зависят от уровня пищи в популяции гидробионтов.

Впервые экспериментально обосновано, что хроническое радиочастотное облучение является экологическим значимым фактором окружающей среды, требующим мониторинга и ограничения длительного радиочастотного воздействия, поскольку обнаружено, что при отсутствии повторного облучения восстановление жизнеспособности популяции *D. magna* произойдет только ко второму поколению животных, а значит, может привести к нарушению гомеостаза популяции.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты вносят вклад в изучение фундаментальных закономерностей биологического действия хронического низкоинтенсивного радиочастотного излучения на биоту. Результаты могут быть использованы для создания базы данных и разработки экологического нормирования электромагнитной нагрузки на природные экосистемы в районах размещения базовых станций сотовой связи. Результаты внедрены в учебный процесс подготовки бакалавров по направлению 06.03.01 – биология в НИЯУ МИФИ.

**Методология и методы исследования.** Работа проведена на лабораторной популяции многоклеточных пресноводных партеногенетически размножающихся беспозвоночных животных *D. magna*. Используются современные методы анализа: метод прижизненной компьютерной морфометрии, спектрофотометрический МТТ-тест для анализа метаболической активности, анализ выживаемости и плодовитости на ежедневной основе в нескольких последовательных поколениях и методы вариационной статистики для обработки полученных результатов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Ювенильный период в жизненном цикле партеногенетически размножающихся ракообразных *D. magna* является чувствительным к

хроническому низкоинтенсивному радиочастотному облучению и критическим для развития полноценного и жизнеспособного потомства.

2. При отсутствии повторного радиочастотного облучения восстановление жизнеспособности популяции *D. magna* произойдет во втором необлученном поколении.

3. Голодание *D. magna* не модифицирует радиационно-индуцированные эффекты хронического радиочастотного облучения, а независимо и значимо снижает плодовитость и приводит к измельчению популяции ракообразных, нарушая защитную стратегию.

**Достоверность результатов.** Достоверность результатов определяется применением современных методов анализа биологических эффектов у беспозвоночных животных *D. magna* с использованием больших объемов экспериментальных данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью тестов Крускала-Уоллеса, Манна-Уитни и  $\chi^2$  с поправкой Бонферрони на множественное сравнение в Statistica 12.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** В соответствии с формулой специальности 1.5.1 Радиобиология, являющейся комплексной научной дисциплиной, изучающей действие ионизирующих и неионизирующих излучений на системы и биологические объекты разных уровней организации и охватывающей проблемы радиочувствительности биологических объектов (п. 5), в диссертационном исследовании представлен анализ биологических эффектов действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения на морфо-функциональные показатели ракообразных, и исследованы механизмы формирования отдаленных эффектов облучения.

**Апробация результатов.** Результаты исследования доложены на международных, всероссийских и региональных конференциях: «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine», Moscow, 2016; «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии», Москва, 2016; «Будущее атомной энергетики – AtomFuture», Москва, 2019; «Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений», Москва, 2019; «Принципы и способы сохранения биоразнообразия», Йошкар-Ола, 2019; «Актуальные проблемы

радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений» BioEMF-2019, Москва, 2019; «Техногенные системы и экологический риск», Обнинск, 2016 – 2020 гг. Исследования по теме диссертации проведены при частичной финансовой поддержке Правительства Калужской области (грант РФФИ № 18-48-400010).

**Личный вклад автора.** Автор лично участвовал в формулировке проблемы, постановке цели и задач, планировании и проведении экспериментов, пробоподготовке образцов для биохимического анализа, проведении МТТ-теста и анализе результатов, подготовке материала для обсуждения на конференциях и публикации статей в научных журналах.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science & Scopus – 6 статей, в научных сборниках по грантам РФФИ – 2 статьи. Материалы диссертации вошли в учебное пособие для студентов вузов.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка используемых источников. Работа изложена на 113 с., содержит 19 рисунков, 11 таблиц. Список литературы включает в себя 156 источника, из них 66 на иностранном языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулирована цель и задачи, научная новизна и практическая значимость исследования.

**Глава 1. Обзор литературы.** В главе проанализированы биологические эффекты низкоинтенсивного радиочастотного излучения на ракообразных *D. magna* и других представителей беспозвоночных и позвоночных животных. Изучены последствия облучения в разные периоды онтогенеза, а также биологические эффекты, обнаруженные в условиях голодания животных.

**Глава 2. Материалы и методы исследования.** В работе использована лабораторная установка электромагнитного излучения (ЭМИ), в которой применен серийный маломощный генератор высокочастотных сигнала Г4-76А. Создание необходимых уровней



плотности потока энергии (ППЭ) в зоне облучения образцов достигали за счет использования пирамидальной рупорной антенны, имеющей узкую диаграмму направленности.

**Облучение** в низкоинтенсивном радиочастотном (НИ РЧ) поле с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> проводили с донной стороны стеклянных стаканов. Время экспозиции составляло пять суток. Доза облучения в каждый период была одинаковой и суммарно составляла 43,2 Дж/см<sup>2</sup>.

**Параметры облучения в ЭМП и схема эксперимента.** Хроническое облучение родительских особей проводили в ювенильный и пубертатный периоды онтогенеза, для чего в соответствии с международными стандартами культивирования *D. magna* (OECD, 2012) были подготовлены партеногенетические группы (табл.1). Животных из последующих поколений не облучали.

Таблица 1. Схема эксперимента

Экспериментальные группы Параметры	I	II	III	IV	V	VI
Доза облучения, Дж/см <sup>2</sup>	0	43,2	43,2	0	43,2	43,2
Этап онтогенеза	ю*/ п*					
Уровень пищи, %	100	100	100	50	50	50

\*ю – ювенильный период онтогенеза, п – пубертатный период онтогенеза

Рачков из первой – третьей групп ежедневно кормили суспензией зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* из расчета 2 мгС/л., рачков из четвертой – шестой групп ежедневно кормили *Ch. vulgaris* из расчета 1 мгС/л.

**Облучение** проводили при температуре 20-21 °С при естественной освещенности. В периоды без облучения *D. magna* содержали в условиях климатостата. *D. magna* из групп физиологического контроля находились в тех же условиях, но без облучения. Пищевой режим в экспериментальных группах на протяжении всего опыта не менялся.

**Облучение *D. magna* в условиях голодания.** Концентрацию корма готовили согласно (OECD, 2012; Федоров, 1979; Мелехова и др., 2010) из расчета 2 мгС/л («пища 100 %») и 1 мгС/л («пища 50 %») по формуле  $V_c = 178,5 \times D_{665}$ , где  $V_c$  – биомасса фитопланктона, мгС/л; 178,5 – пересчетный коэффициент;  $D_{665}$  – оптическая плотность суспензии *Ch. vulgaris* соответствующая длине волны 665 нм, измеренной на спектрофотометре КФК-3 (Россия) в кювете толщиной 1 см.

**Анализ выживаемости и плодовитости** проводили согласно методическим рекомендациям по использованию ракообразных *D. magna* в экотоксикологических экспериментах (OECD, 2012). Наблюдение за выживаемостью и плодовитостью *D. magna* в облученном поколении F0 и у необлученного потомства F1 – F3 велось на ежедневной основе в течение 21 суток в каждом поколении. Для каждой экспериментальной и контрольной групп в экспериментах определяли количество животных, выживших к 21 сут, а также количество новорожденных на самку, число пометов и новорожденных на помет.

**Морфометрические измерения** проводили индивидуально у 5, 10- и 21-суточных *D. magna* во всех анализируемых поколениях согласно рекомендациям, приведенным в (Тирас, Сахарова, 1984; Ускалова и др., 2013). Для фиксирования изображения использовали систему видеонаблюдения, состоящую из цифровой камеры MYscope 300 M 3 Mpix, USB 2.0 (WEBBERS), вмонтированной в окуляр микроскопа МБС-10 с выходом на монитор компьютера Pentium IV в программе ScopePhoto. Обработку видеоизображения осуществляли с помощью программного обеспечения «Морфометр «Image-Pro». На каждом зафиксированном изображении измеряли длину тела животного и хвостового шипа.

**Метаболическую активность** и соотношения живых и мертвых клеток у облученных и необлученных *D. magna* определяли колориметрическим МТТ-методом (Van Meerloo et al., 2011).

**Статистический анализ** Гомогенность внутри экспериментальных и контрольных групп оценена с помощью теста Крускала-Уоллеса, значимость отличий от контроля количественных признаков оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни, качественных признаков –  $\chi^2$ -тестом (Hosmer et al., 2008; Жаворонков, 2011). Для уменьшения ложноположительных результатов проведена поправка Бонферрони на множественное сравнение (Lehmann, Romano, 2005). Проверка значимости влияния облучения, уровня пищи и их взаимодействия на изменение биологических показателей выполнена с применением двухфакторного дисперсионного анализа.

### Глава 3. Результаты и их обсуждение

**Анализ выживаемости.** Из рис. 1А видно, что на 9-е сутки происходит первый спад выживаемости в выборке, облученной в ювенильный период. Эти изменения приходятся на период созревания, характерный для индивидуального развития животных, когда происходит формирование и развитие эмбрионов (Ebert, 2005). К 15-суточному возрасту выживаемость животных снижается до 86 % и остается на этом уровне до 21-суточного возраста.

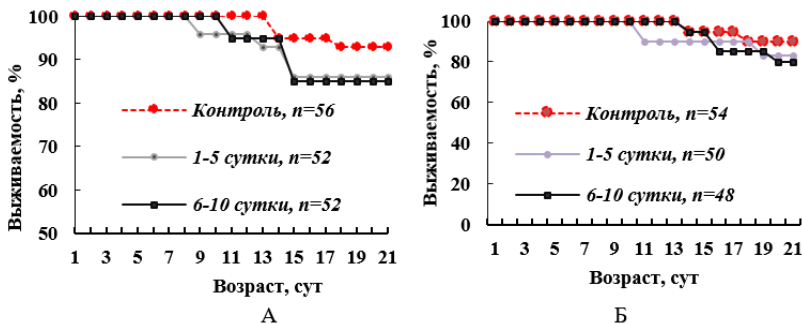


Рис. 1. Динамика выживаемости *D. magna* из поколения F0 (А) и F1 (Б) после хронического радиочастотного облучения в ювенильный (1-5 сут) и пубертатный (6-10 сут) период онтогенеза

Выживаемость в группе, облученной в период созревания (6 – 10 сут), начинает снижаться на 11 сут после воздействия и к 21-суточному возрасту рачков составляет 85 %. При попарном сравнении с применением критерия  $\chi^2$  значимое снижение выживаемости не обнаружено. Для пары сравнения «Контроль – «1-5 сут»  $\chi^2 = 1,32$ ;  $P = 0,5$ ; для пары «Контроль – «6-10 сут»  $\chi^2 = 0,01$ ;  $P = 1$ . Статистический анализ показал, что облучение родительского поколения в ювенильный и пубертатный период не привело к изменению выживаемости необлученного потомства. Анализ литературы показал, что нарушение выживаемости *D. magna* не происходит при действии террагерцового НИ ЭМИ (42,25 ГГц) (Гапочка и др., 2012; Газимагомедова и др., 2018) и острого низкоинтенсивного лазерного и ультрафиолетового излучения (Осипова и др., 2011), что согласуется с полученными нами данными.

**Анализ плодовитости.** В эксперименте, направленном на анализ трансгенерационных радиационно-индуцированных эффектов изменения плодовитости в облученном поколении F0 и в необлученных поколениях F1, F2 и F3, *D. magna* начинали производить потомство в среднем с 9-суточного возраста, что соответствует норме (Ebert, 2005). Статистический анализ показал, что численность потомства значительно меньше ( $p = 5,41 \times 10^{-7}$ ) у особей, облучённых в ювенильный период из-за уменьшения размера пометов ( $p = 0,0001$ ). Облучение в пубертатный период не влияет на плодовитость *D. magna* ( $p = 0,05$ ). На рис. 2 видно, что число пометов и новорожденных в помете снижается только при облучении самок в ювенильный период.

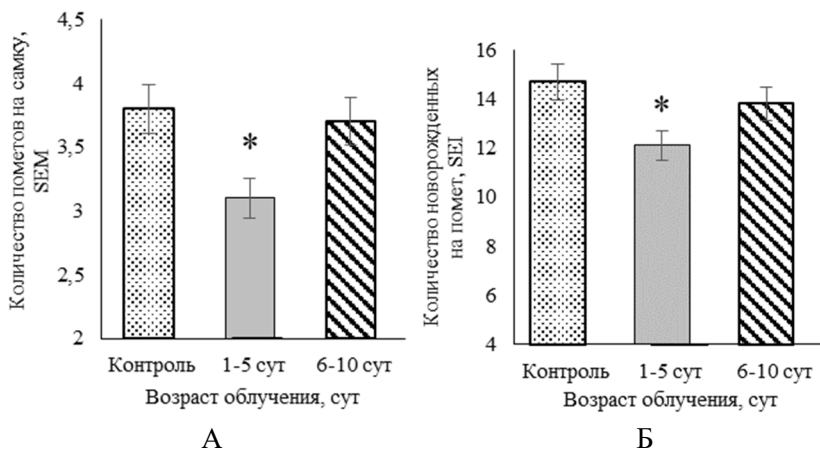


Рис 2. Среднее количество пометов на самку *D. magna* (А) и новорожденных на помет (Б) к 21-м суткам после НИ РЧ облучения с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный (1-5 сут) или пубертатный (6-10 сут) период онтогенеза в родительском поколении (\* $p < 0,05$ )

В табл. 2 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа, показывающего вклад радиационного фактора в изменение плодовитости в облученном и пострadiационных поколениях.

Таблица 2. Двухфакторный дисперсионный анализ радиационно-индуцированного эффекта хронического радиочастотного облучения на изменение плодовитости ракообразных *D. magna*

Факторы	Количество новорожденных на <i>Daphnia</i>		Количество о пометов		Количество новорожденных на помет	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Вся выборка <i>Daphnia</i> , <i>N</i> = 375						
Выжившие к концу эксперимента <i>Daphnia</i> , <i>N</i> = 318						
Облучение	19,03	<b>1,40 x 10<sup>-8</sup></b>	3,19	0,04	11,09	<b>2,12 x 10<sup>-5</sup></b>
Поколение	4,54	<b>0,004</b>	0,88	0,45	9,15	<b>7,56 x 10<sup>-6</sup></b>
Взаимодействие	4,18	<b>0,0004</b>	1,07	0,38	2,27	0,04
	R <sup>2</sup> = 0.20		R <sup>2</sup> = 0.06		R <sup>2</sup> = 0.19	

Известно, что плодовитость является более чувствительным критерием, чем выживаемость. В ювенильный период онтогенеза происходит закладка партеногенетических яиц и активный рост взрослых особей, клетки которых активно делятся. В ряде работ показано, что в этот период организм наиболее подвержен влиянию негативных факторов среды. Обнаружено, что радиочастотное излучение вызывает сильный митотоксический эффект (Песня и др., 2001), значимый в диапазоне 800–930 МГц (Лаврский и др., 2013). Видимо, в ювенильный период жизненного цикла в организме *D. magna* происходит перераспределение энергии для эффективных обменных процессов взрослого организма, приводящее к снижению уровня подачи энергии на воспроизводство. В более поздние этапы развития, каким является пубертатный период онтогенеза, митотическая активность клеток снижается, и эффекты НИ РЧ излучения уже не оказывают столь заметного влияния на репродуктивную функцию. Подтверждение вышесказанного являются эффекты, обнаруженные нами в пострадиационных поколениях, полученных от хронически облученных в радиочастотном поле родительских особей. В табл. 3 приведены количественные характеристики изменения основных компонентов плодовитости *D. magna* в необлученных поколениях F1...F3.

Таблица 3. Радиационно-индуцированные изменения компонентов общей плодовитости у *D. magna* в необлученных поколениях F1 – F3

	Период облучения	
	Ювенильный	Пубертатный
<b>Поколение F1</b>		
Количество новорожденных на особь: Контроль 47,8 ± 1,4		
<i>M ± SE</i>	40,8 ± 2,1	38,6 ± 3,5
<i>P</i> *	<b>0,01</b>	0,04
Prob <sup>†</sup>	0,0001	0,0003
Количество пометов: Контроль 3,81 ± 0,07		
<i>M ± SE</i>	3,66 ± 1,16	3,35 ± 0,28
<i>P</i> *	0,33	1
Prob <sup>†</sup>	0,002	0,04
Количество новорожденных на помет: Контроль 12,63 ± 0,38		
<i>M ± SE</i>	11,06 ± 0,40	11,72 ± 0,90
<i>P</i> *	<b>0,0001</b>	0,032
Prob <sup>†</sup>	0,0001	0,03
<b>Поколение F2</b>		
Количество новорожденных на особь: Контроль 51,6 ± 1,4		
<i>M ± SE</i>	43,88 ± 2,7	35,3 ± 1,6
<i>P</i> *	<b>0,004</b>	0,01
Prob <sup>†</sup>	0,01	0,03
Количество пометов: Контроль 3,94 ± 0,07		
<i>M ± SE</i>	3,41 ± 0,19	3,25 ± 0,28
<i>P</i> *	0,06	0,23
Prob <sup>†</sup>	0,10	0,09
Количество новорожденных на помет: Контроль 13,05 ± 0,38		
<i>M ± SE</i>	12,96 ± 0,45	11,88 ± 1,04
<i>P</i> *	0,16	1
Prob <sup>†</sup>	0,04	0,65
<b>Поколение F3</b>		
Количество новорожденных на особь: Контроль 50,9 ± 1,4		
<i>M ± SE</i>	48,05 ± 1,79	49,12 ± 3,0
<i>P</i> *	0,66	1
Prob <sup>†</sup>	1	0,88
Количество пометов: Контроль 3,52 ± 0,07		
<i>M ± SE</i>	3,8 ± 0,14	3,41 ± 0,21
<i>P</i> *	0,37	1
Prob <sup>†</sup>	1	0,97
Количество новорожденных на помет: Контроль 15,11 ± 0,38		
<i>M ± SE</i>	12,85 ± 0,52	14,80 ± 0,74
<i>P</i> *	0,16	0,63
Prob <sup>†</sup>	1	0,59

\* Вероятность теста Крускала-Уоллиса для сравнения с контрольной группой с поправкой Бонферрони. † Вероятность гомогенности всех групп по тесту Крускала-Уоллиса.

**Анализ морфометрических изменений.** Согласно полученным данным, представленным на рис. 3, линейный размер особей *D. magna* к 10-суточному возрасту был значимо меньше, чем в контрольных группах как после хронического облучения в ювенильный период ( $p = 0,01$ ), так и после облучения пубертатный период ( $p=0,03$ ).

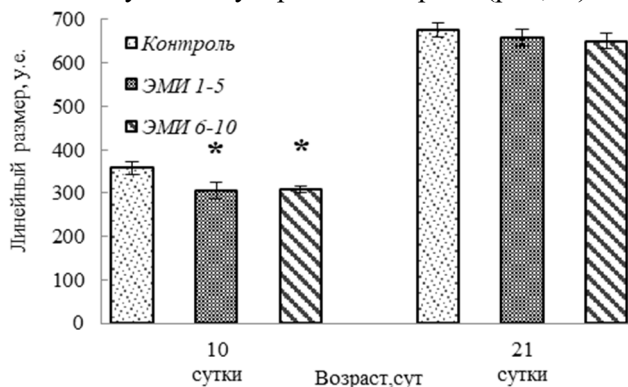


Рис. 3. Изменение линейных размеров родительских особей *D. magna* в контрольной группе и после НИ РЧ воздействия с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный (1-5 сут) и пубертатный (6-10 сут) период онтогенеза (\* $p<0,05$ )

К 21-суточному возрасту животные, облученные в исследуемые периоды онтогенеза, выравнивались по линейным размерам с особями из контрольных групп. Эта тенденция сохранялась в трех необлученных поколениях.

**Анализ метаболической активности и жизнеспособности клеток.** Для анализа механизмов биологического действия хронического НИ РЧ излучения на *D. magna* была проведен биохимический анализ с помощью МТТ-теста на цитотоксичность (Van Meerloo et al., 2011). МТТ-тест позволяет интегрально оценить активность свободнорадикальных реакций, инактивацию митохондриальных дегидрогеназ, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов.

Проведенный анализ гомогенности измеряемых показателей МТТ-теста в каждой из контрольных групп *D. magna* родительского и каждого из трех поколений в разных повторах опытов показал отсутствие статистически значимой разницы по тесту Крускала-

Уоллиса ( $0,09 < P < 0,99$ ). Это позволило в дальнейшем использовать объединенный контроль. Согласно полученным данным, представленным на рис. 4, хроническое облучение *D. magna* в РЧ ЭМП в дозе  $43,2 \text{ Дж/см}^2$  в ювенильный период приводило к цитотоксическому эффекту, который был обнаружен по снижению ОП в образцах облученных особей ( $p=1,19 \cdot 10^{-14}$ ).

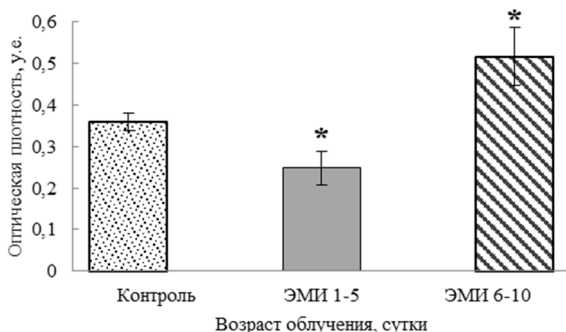


Рис. 4. Средние показатели МТТ-теста, характеризующие изменение метаболической активности и жизнеспособности *D. magna* в контрольных и хронически облученных в ювенильный (1-5 сут) и пубертатный (6-10 сут) периоды онтогенеза

Хроническое облучение в РЧ ЭМП в пубертатный период приводило к повышению ОП в образцах облученных *D. magna* ( $p=1,67 \cdot 10^{-5}$ ). На графике представлены усредненные значения МТТ-теста, полученные в образцах животных из разных возрастных групп. При этом между эффектами в непосредственно облученном поколении и эффектами, полученными у потомства *D. magna*, также существуют значимые различия. Дисперсионный анализ позволил выявить высокий вклад облучения в наблюдаемый эффект (табл. 4).

Известно, что ЭМП усиливает генерацию активных форм кислорода, которые инициируют процессы перекисного окисления липидов мембран и нарушают внутримембранные потоки энергии, связанные в митохондриях с синтезом АТФ (Гудков и др., 2014; Ragu, 2015; Manta et al., 2014). Окислительные процессы могут приводить к гибели клеток многоклеточного организма, нарушать развитие и рост эмбриона (Merhi, 2012). Видимо, часть клеток погибает, но на



жизнеспособности особи это не отражается. Данное предположение основано на результатах нашего исследования.

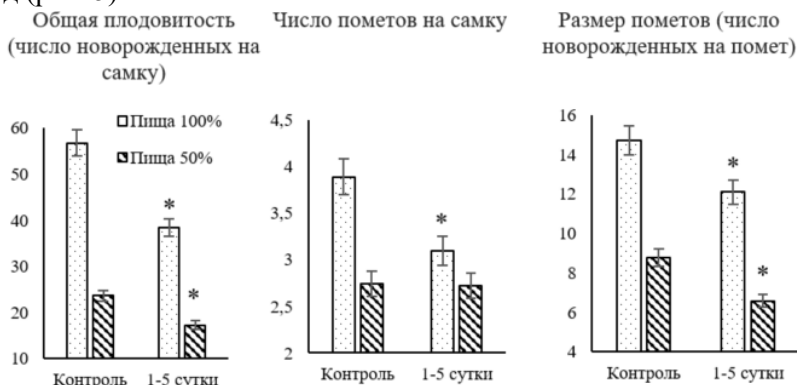
Таблица 4. Двухфакторный дисперсионный анализ вклада хронического радиочастотного облучения и возраста *D. magna* в изменение метаболической активности и жизнеспособности клеток в родительском и первом необлученном поколении

Фактор	Сумма квадратов	df	Средний квадрат	F	P
<b>Родительское поколение F0</b>					
Облучение	0.30	1	0.30	15.98	<b>0.0001</b>
Возраст	0.31	2	0.18	8.27	<b>0.0004</b>
Взаимодействие	0.19	2	0.09	5.12	<b>0.007</b>
<b>Первое поколение F1</b>					
Облучение	0.03	1	0.03	7.74	<b>0.007</b>
Возраст	0.15	2	0.08	19.61	<b>3.96x10<sup>-7</sup></b>
Взаимодействие	0.007	2	0.003	0.92	0.40

Снижение выживаемости облученных в разные периоды онтогенеза животных не наблюдали, однако обнаружили, что хроническое облучение *D. magna* в РЧ ЭМП в ювенильный период приводило к снижению плодовитости. После облучения в мембранах митохондрий под действием супероксиданион радикалов могут развиваться деструктивные процессы, что по разным источникам, приводило к снижению уровня ферментативной активности, нарушению морфологических процессов (Мелехова, 2010; Мелехова и др., 2012), а также к сокращению продолжительности жизни дрозофилы (Зайнуллин и др., 2001; Москалев, 2013) и, вероятно, являлось причиной замедления роста *D. magna* и снижения их плодовитости при хроническом РЧ облучении в ювенильный период онтогенеза. Таким образом, в проведенном исследовании обнаружено, что хроническое облучение в ЭМП с частотой 900 МГц, ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в дозе 43,2 Дж/см индуцирует нарушение метаболических процессов у облученных *D. magna* и у их потомства из поколения F1. Во втором поколении эффект нивелируется.

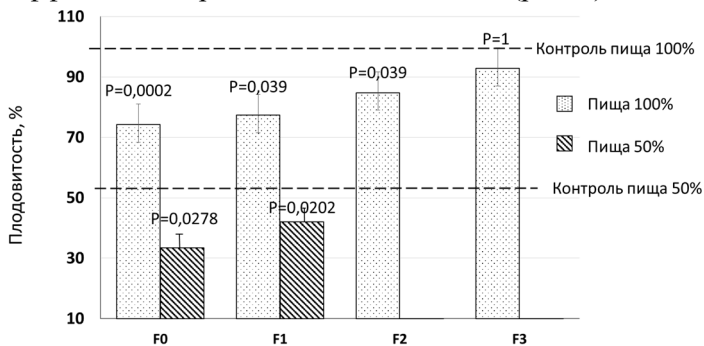
**Модификация эффекта облучения при голодании.** Согласно полученным данным, облучение *D. magna* в ЭМП с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный (1-5 сут) и пубертатный (6-10 сут)

период в условиях голодания не изменяло выживаемость, однако привело к снижению плодовитости при облучении в ювенильный период (рис. 5).



**Рис. 5.** Плодовитость *D. magna* к 21-уточному возрасту после хронического НИ РЧ воздействия с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный период (\* $p < 0,05$ )

Дисперсионный анализ показал, что облучение и голодание значимо и независимо изменяют плодовитость *D. magna* за счет снижения числа новорожденных в пометах. Действие этих факторов при облучении в ювенильный период нарушило плодовитость необлученных поколений F1 и F2. Эффект нивелировался к поколению F3 (рис. 6).



**Рис. 6.** Плодовитость *D. magna* к 21-суточному возрасту в облучённом поколении F0 и в необлучённом потомстве F1 – F3 при разном уровне пищи

Проведенный нами корреляционный анализ позволил обнаружить нарушение корреляции между размером тела и длиной шипа при голодании животных. Различия в коэффициентах корреляции

составили:  $\chi^2 = 39,88$ ;  $df=1$ ;  $P = 2,72 \times 10^{-10}$ . При голодании *D. magna* выявлено нарушение корреляции также между возрастом животных и длиной шипа ( $\chi^2 = 4,32$ ;  $df=1$ ;  $P = 0,04$ ). Согласно полученным данным, различия в коэффициентах корреляции между линейным размером тела и возрастом *D. magna* в условиях голодания для всей исследуемой выборки составили  $\chi^2 = 1,48$ ;  $df=2$ ;  $P = 0,48$ , а между возрастом и длиной шипа –  $\chi^2 = 8,28$ ;  $df=1$ ;  $P = 0,14$ .

Таким образом, облучение не оказывает достоверного влияния на возрастную динамику морфологических изменений у *D. magna*, а голодание приводит не только к замедлению роста в целом, но и нарушению роста хвостового выроста. Изменения зрительного анализатора, карапакса, выполняющего функцию опорного и защитного скелета, состояния антенн и другие тератогенные эффекты при исследуемых параметрах облучения не обнаружены. С использованием Двухфакторным дисперсионным анализом установлено, что хроническое облучение *D. magna* в ЭМП вызывает снижение МТТ-показателя, т.е. оказывает на клетки облученных животных цитотоксический эффект. Ограничение пищевых ресурсов снижает резистентность организма, поэтому метаболическая активность клеток не восстанавливается к 21 суткам как происходило при оптимальном пищевом режиме.

В главе **Заключение** обобщены полученные в диссертационном исследовании закономерности формирования биологических эффектов при хроническом радиочастотном облучении в разные периоды онтогенеза. Показано, что облучение в ювенильный период приводит к снижению плодовитости в облученном поколении и сохраняется в первом поколении необлученного потомства. Уменьшение размеров шипа и временное измельчение популяции является показателем негативного влияния облучения на защитную стратегию популяции ракообразных. Тем самым показана биологическая значимость радиочастотного воздействия как фактора окружающей среды, требующего контроля в рамках экологического мониторинга. Репродуктивный процесс восстанавливается к поколению F2. Таким образом, из полученных результатов можно заключить, что при отсутствии повторного облучения в радиочастотном поле, произойдет

восстановление жизнеспособности популяции *D. magna* во втором необлученном поколении.

## ВЫВОДЫ

1. Хроническое низкоинтенсивное радиочастотное облучение ракообразных *D. magna* в ювенильный период онтогенеза с частотой 900 МГц, ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в дозе 42,3 Дж/см<sup>2</sup> не изменяло выживаемость облученного и трех последующих поколений, однако приводило к значимому снижению плодовитости за счет уменьшения размера пометов, т.е. облучению в большей степени подвергались половые клетки животных.

2. Обнаружен цитотоксический эффект хронического ЭМИ с исследуемыми параметрами. Выявлено, что одним из механизмов формирования биологических эффектов является изменение метаболической активности и жизнеспособности клеток в облученном поколении *D. magna* и у потомства в первом необлученном поколении.

3. Выявлено отставание в росте на ранних этапах жизненного цикла у облученных в разные периоды онтогенеза *D. magna* и их необлученного потомства. Облучение не влияло на возрастную динамику морфометрических изменений и к 21-суточному возрасту линейные размеры животных возвращались к физиологической норме. Тератогенное действие ЭМИ с исследуемыми параметрами не выявлено.

4. Факторы хронического радиочастотного облучения и недостатка пищи независимо и значимо влияли на снижение плодовитости и нарушение процесса роста в трех поколениях ракообразных *D. magna*. Выживаемость животных при хроническом радиочастотном облучении в условиях голодания не изменялась. Цитотоксический эффект являлся следствием только облучения.

5. Хроническое низкоинтенсивное радиочастотное облучение ракообразных *D. magna* в ювенильный период онтогенеза является значимым фактором окружающей среды, требующим контроля в рамках экологического мониторинга. При отсутствии повторного облучения в радиочастотном поле восстановление жизнеспособности популяции *D. magna* произойдет во втором поколении.

## Заключение

Безопасность развития мобильной связи подразумевает необходимость создания единого подхода для реальной оценки последствий электромагнитного загрязнения для населения и природных сообществ. Обнаруженные в ходе диссертационной работы закономерности и механизмы формирования радиационных эффектов могут быть направлены на разработку технологии интегральной оценки экологической безопасности регионов и городов России. Полученные новые экспериментальные и теоретические данные внесут существенный вклад в решение этой проблемы.

## ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В рецензируемых изданиях, в том числе индексируемых базами данных WoS и Scopus

1. Zhalnina AA, Uskalova DV, Ustenko KV, Savina NB. The long-term effects of combined chronic exposure to low-intensity radiofrequency electromagnetic fields and different food quantity on crustaceans *D. magna* // J. of Physics: Conference Series, V.1701, 2020, p. 012014 (**WoS и Scopus**).

2. Sarapultseva, E.I., Morozova, A.O., Kolesnikova, N.I., Savina, N.B., Uskalova, D.V., Ustenko, K.V. Analysis of the heart rate in a model test organism *Daphnia magna* as a new approach to the assessment of radioecological effects of irradiation // Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zawedeniy, Yadernaya Energetika, 2020 (2), pp. 146-155 (**Scopus**).

3. Sarapultseva E.I., Uskalova D.V., Ustenko K.V. Biological effects of low-intensity radiofrequency fields and risk assessment for biota / Биологические эффекты низкоинтенсивных радиочастотных полей и анализ риска для природных систем // Медицина труда и промышленная экология. 2020. Т. 60. № 9. С. 592-596 (**Scopus**).

4. Sarapultseva E., Ustenko K., Dubrova Y. The combined effects of acute irradiation and food supply on survival and fertility in *D. magna* // J. Environmental Radioactivity. 2019. 199–200. P. 75-83 (**WoS и Scopus**)

5. Устенко К.В., Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Отдаленные биологические эффекты низкоинтенсивного радиочастотного облучения *D. magna* в разные периоды онтогенеза // Биомедицинская радиоэлектроника, 2017. – № 4. С. 16-24 (**ВАК**).

6. Sarapultseva E., Uskalova D., Savina N., **Ustenko K.** Medical-biological aspects of radiation effects in *D. magna* // Journal of Physics: Conf. Series, 2017. 784 (1) 012052. P. 1-6 (**WoS** и **Scopus**).

### **В научных сборниках и материалах конференций**

7. Сарапульцева ЕИ, Ускалова Д.В., **Устенко К.В.** Механизмы и закономерности формирования трансгенерационных эффектов при радиационном воздействии на примере беспозвоночных животных / В сб.: Труды регион. конкурса проектов фундаментальных научных исследований. Вып. 3. Калуга: КГИРО, 2020. С. 223-238.

8. Сарапульцева ЕИ, Савина Н.Б., Ускалова Д.В., **Устенко К.В.** Анализ фазовых переходов на кривой выживаемости *D. magna* после  $\gamma$ -облучения / Труды регионального конкурса научных проектов. Выпуск 2, Калуга: КГИРО, 2019. С.109-113.

9. Сарапульцева ЕИ, Каленков Г.С., Ускалова Д.В., **Устенко К.В.** Новый подход к оценке радиоэкологических последствий облучения / В кн.: Будущее атомной энергетики – AtomFuture 2019. Тезисы докладов XV международной научно-практической конференции, МИФИ, 2020. С. 46-47.

10. Жалнина А.А., Ускалова Д.В., Дорохов А.В., **Устенко К.В.** Морфо-функциональные эффекты НИ РЧ облучения *D. magna* в ювенильный период в условиях голодания / В кн.: XVI регион. (III междунар.) науч. конф.. Матер. конфер. Обнинск, 19-20 апреля 2020 г. – М: НИЯУ МИФИ, 2020. С. 187-188.

11. **Устенко К.В.**, Ускалова Д.В., Сарапульцева ЕИ. Изменение морфо-физиологических параметров *D. magna* при хроническом действии ЭМП базовых станций сотовой связи в условиях голодания / В сб.: Актуальные проблемы экологии и природопользования. Материалы национальной научно-практической конфер. студентов, аспирантов, молодых ученых и спец., Москва, 2020. С. 83-85.

12. **Устенко К.В.**, Ускалова Д.В. Эффекты облучения в низкоинтенсивном радиочастотном поле в условиях голодания на примере беспозвоночных животных / Всероссийская конференция «Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений» BioEMF-2019, 12-13 ноября 2019 г., Москва. DVD-ROM

13. Ускалова Д.В. **Устенко К.В.** Оценка закономерностей формирования острых и отдаленных эффектов гамма-облучения на примере гидробионтов / Всероссийская конференция «Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений» (12-13 ноября 2019 г., г. Москва.) BioEMF-2019. DVD-ROM.

14. **Устенко К.В.**, Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Роль биотических и абиотических факторов в проявлении радиационных эффектов у низших

ракообразных / Труды междунар. конфер. «Принципы и способы сохранения биоразнообразия» (18–22 марта 2019 года, Йошкар-Ола). С. 238 – 240.

15. Ускалова Д.В., Маркина Е.С., **Устенко К.В.** Сравнение цитотоксического эффекта ЭМИ у *Daphnia magna* и *Dugesia tigrina* / В кн.: Техногенные системы и экологический риск. Тезисы докл. I междунар. научной конфер. Под общ. ред. А.А. Удаловой. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2017. С. 235-237.

16. **Устенко К.В.**, Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Изменение демографических и биохимических показателей у *D. magna* при хроническом действии ЭМП базовых станций сотовой связи / В кн.: Техногенные системы и экологический риск: Тезисы докладов XIII региональной научной конференции. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2016. С. 135-137.

17. **Устенко К.В.**, Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Отдаленные биологические эффекты низкоинтенсивного радиочастотного облучения *D.magna* в разные периоды онтогенеза / Труды междунар. симпозиума «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии». 25-28 октября 2016 г. – М.: ГЕОС, 2016. С. 400.

18. Sarapultseva E., Uskalova D., Savina N., **Ustenko K.** Medical-biological aspects of radiation effects in *D. magna* / I<sup>st</sup> Int. Symposium "Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine". October 18-23, 2016, Moscow, С.107.

19. Сарапульцева Е.И., Соколова Ю.Д., **Устенко К.В.** Интерактивные формы обучения в высшем учебном заведении: учебное пособие для бакалавров, обучающихся по направлению «Биологические науки» и «Химия». – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2016. 71 с.

Редактор З.И. Сныкова  
Компьютерная верстка автора

---

ЛР N 020713 от 27.04.1998

Подписано к печати 21.07.2021

Формат бумаги 60x84/16

Печать ризограф

Бумага KYMLUX

Печ.л. 1,5

Заказ N

Тираж 100 экз.

Цена договорная

---

Отдел множительной техники ИАТЭ  
249040, г. Обнинск, Студгородок, 1